

Análisis de aneuploidías por las técnicas de QF-PCR y cariotipo en los años 2012-13 en el HU Miguel Servet de Zaragoza

EVA BARRIO OLLERO

Genética y Reproducción, HU Miguel Servet
Dpto. Anatomía e Histología Humanas. Universidad de Zaragoza
PhD. Bioquímica

Tutora: Silvia Izquierdo Álvarez
Genética y Reproducción, HU Miguel Servet
FEA Genética

TITULO: ANALISIS DE ANEUPLOIDIAS POR LAS TECNICAS DE QF-PCR Y CARIOTIPO EN LOS AÑOS 2012-13 EN EL H.U. MIGUEL SERVET, DE ZARAGOZA

RESUMEN

Objetivos: El objetivo de este estudio es poner de manifiesto si la QF-PCR, técnica de diagnóstico prenatal para las aneuploidías de reciente puesta a punto es realmente eficaz y presenta alguna ventaja a la hora de poder compararla con el cariotipo que es la técnica de rutina en nuestro laboratorio

Material y métodos: Los datos provienen del Laboratorio de Genética del Hospital Universitario Miguel Servet, durante los años 2012 y 2013. Las muestras provienen de toda la Comunidad Autónoma de Aragón. Se recogen muestras desde enero del 2012 hasta el presente. Mediante el software PRISCA V4.0. El punto de corte utilizado es 1/250 para trisomía 21 y 1/100 para la trisomía 18. Se hace un análisis de las variables de la base de datos. Distribución de patología cromosómica por sexo fetal, por indicación diagnóstica.

Conclusión: Cariotipo y QF-PCR detectan de la misma forma anomalías cromosómicas, por tanto los criterios de elección tienen que ser distintos de los límites de detección de aneuploidias. Sin embargo QF-PCR es más sencilla y rápida aunque más cara. Para confirmar las patologías encontradas se debe realizar un FISH

Palabras clave: Diagnóstico prenatal, cariotipo, QF-PCR

Agradecimientos: Al personal del laboratorio de Genética y Reproducción, a las Dras. Alcaine, Miramar y Rodríguez. A mi tutora, la Dra. Izquierdo y al Dr. González, Jefe de Sección. A mis compañeras de la Universidad, Dras. Conde, Gascón y Santolaria.

INDICE

Introducción.....	3
Material y métodos.....	5
Cribado prenatal de alteraciones cromosómicas fetales.....	5
Cribado prenatal de las aneuploidías fetales más comunes.....	5
Marcadores ecográficos.....	6
Marcadores bioquímicos.....	7
Técnicas invasivas.....	7
Biopsia corial.....	8
Amniocentesis.....	8
Técnicas de diagnóstico citogenética y molecular.....	9
QF-PCR.....	9
Cariotipo.....	9
FISH.....	10
Cálculo de riesgo.....	10
Descripción de las variables.....	10
Resultados.....	12
Distribución de las patologías por sexo.....	15
Sexo femenino.....	15
Sexo masculino.....	18
Distribución de las patologías por indicación diagnóstica.....	20
QF-PCR.....	20
Cariotipo.....	22
Edad materna.....	24
Discusión.....	25
Conclusiones.....	27
Bibliografía	28

INTRODUCCION

El término «diagnóstico prenatal» agrupa todas aquellas acciones diagnósticas encaminadas a descubrir durante el embarazo un «defecto congénito», entendiendo por tal «toda anomalía del desarrollo morfológico, estructural, funcional o molecular presente al nacer (aunque puede manifestarse más tarde), externa o interna, familiar o esporádica, hereditaria o no, única o múltiple» (Comités de Trabajo de la OMS, 1970, 1975, 1982).

El diagnóstico prenatal tiene como finalidad diagnosticar con la mayor precocidad posible un defecto congénito o bien establecer la ausencia del mismo, ya que la confirmación de la normalidad contribuye a reducir la ansiedad materna durante el resto de la gestación.

El síndrome de Down, el síndrome de Edwards y el síndrome de Patau son las tres trisomías autosómicas viables más frecuentes. Las incidencias en nacidos vivos son aproximadamente 1:700, 1:3000 y 1:21.700, respectivamente. Las aneuploidías de los cromosomas sexuales más frecuentes son el síndrome de Turner en mujeres y el síndrome de Klinefelter en varones. La causa más frecuente del síndrome de Turner es la monosomía del cromosoma X (cariotipo 45, X), y la del síndrome de Klinefelter, una copia adicional del cromosoma X (cariotipo 47, XXY). Las incidencias en nacidos vivos son entre 1:2000 y 1:5000 mujeres en el caso del síndrome de Turner y entre 1:500 y 1:650 varones en el del síndrome de Klinefelter (1).

El nombre de síndrome de Down viene del Dr. John Langdon Down, y se introdujo en 1866, aunque ya se había descrito anteriormente. Es causado por una trisomía de la totalidad o de parte del cromosoma 21 (2). Además de una discapacidad cognitiva de mayor o menor grado, los individuos con síndrome de Down suelen compartir una serie de características comunes, como hipotonía (bajo tono muscular), lengua prominente, ojos en forma de almendra debido a un pliegue epicántico, fisuras palpebrales oblicuas ascendentes, pliegue palmar único y extremidades más cortas de lo normal. También tienen un mayor riesgo de defectos cardíacos congénitos y de presentar una forma de la enfermedad de Alzheimer al envejecer.

El síndrome de Edwards fue descrito por primera vez por el Dr. John Edwards en 1960. Es causado por una trisomía de la totalidad o de parte del cromosoma 18. Como en el síndrome de Down, el riesgo de tener un niño con síndrome de Edwards aumenta con la edad materna. Las características clínicas típicas incluyen bajo peso al nacer, defectos cardíacos, malformación gastrointestinal, malformación urogenital, problemas

neurológicos y anomalías craneofaciales. La mediana del tiempo de supervivencia es de unos 4 días.

El nombre síndrome de Patau viene del Dr. Klaus Patau, que describió la enfermedad con la asociación cromosómica. Es causado por una trisomía de la totalidad o de parte del cromosoma 13. Los bebés con síndrome de Patau están gravemente afectados por diversas anomalías. Las características típicas incluyen retraso del crecimiento intrauterino, bajo peso al nacer, defectos cardiacos congénitos, microcefalia, holoprosencefalia con fisura palatina y microftalmia, apnea central, polidactilia y pies en mecedora. La mediana del tiempo de supervivencia es de unos 2,5 días.

El síndrome de Turner en mujeres es causado por una monosomía del cromosoma X. Aproximadamente el 98 % de los embarazos de fetos con síndrome de Turner acabarán en aborto espontáneo. Las niñas supervivientes muestran una serie de características típicas, como corta estatura, amenorrea primaria y cuello palmeado (derivado de higroma quístico, un saco relleno de líquido, en el útero). También suelen sufrir cardiopatía congénita y pueden tener riñones en forma de herradura.

El síndrome de Klinefelter en varones es causado por la presencia de una copia adicional del cromosoma X. Los varones con síndrome de Klinefelter son estériles y pueden tener una discapacidad cognitiva leve. Suelen ser más altos que la media, pueden presentar ginecomastia que requiera reducción quirúrgica, y tienen un mayor riesgo de osteoporosis debido a los menores niveles de testosterona.

El diagnóstico prenatal es un tema de importante de Salud Pública ya que muchas de las mujeres embarazadas requieren de alguna técnica diagnóstica para detectar algún defecto congénito. Las técnicas de análisis y filiación de las patologías más frecuentes llevan mucho tiempo realizándose, pero con el avance científico, se van descubriendo nuevas técnicas que ganan en rapidez, fiabilidad y sensibilidad, pero que pueden resultar más costosas.

El objetivo de este estudio es verificar si la Quantitative Fluorescence Polymerase Chain Reaction (QF-PCR), técnica de diagnóstico prenatal para las aneuploidías de reciente implementación en los laboratorios de genética es realmente efectiva y presenta alguna ventaja a la hora de poder compararla con el cariotipo que es la técnica de rutina que se estaba empleando hasta la actualidad en los laboratorios de diagnóstico prenatal.

MATERIAL Y METODOS

Los datos recopilados y analizados en el presente trabajo provienen del Laboratorio de Genética del Hospital Universitario Miguel Servet, durante los años 2012 y 2013.

Material

Las muestras estudiadas desde enero del 2012 hasta la actualidad provienen de toda la Comunidad Autónoma de Aragón: Hospital de Barbastro de Huesca, Hospital de Alcañiz, Hospital Obispo Polanco de Teruel, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza y desde la consulta de diagnóstico Prenatal del Hospital Universitario Miguel Servet.

Métodos

Los datos se han tratado con la anonimidad, la confidencialidad y la seguridad de los datos como se exige en la Ley de Protección de Datos. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el programa SPSS versión 19.0.

Cribado prenatal de alteraciones cromosómicas fetales

En la actualidad se dispone de métodos efectivos de cribado que combinan información clínica, bioquímica y ecográfica de cada gestante de aquellas alteraciones cromosómicas en las que dicho cribado solo se basa en la información proporcionada por la ecografía junto a datos clínicos de la embarazada.

Cribado prenatal de las aneuploidías fetales más comunes

En el ámbito de la detección de las cromosomopatías fetales, la trisomía 21 o síndrome de Down ha sido uno de los objetivos prioritarios por tratarse de la aneuploidía más frecuente en recién nacidos vivos y la causa más frecuente de retraso mental severo. Dada la estrecha relación existente entre cromosomopatía fetal y edad materna, esta se ha empleado como criterio para la selección de las gestantes candidatas a una técnica invasiva y, de hecho, hasta hace poco tiempo ha sido el método más empleado, ofreciéndose generalmente una técnica invasiva cuando la gestante tenía una edad ≥ 35 años. Debido a la cantidad de falsos positivos, que superaban la tasa del 5% admitidos en un cribado poblacional, se recomienda no realizar el cribado únicamente por edad.

En el día a día se utilizan otros métodos de cribado que calculen el riesgo de síndrome de Down teniendo en cuenta no solo la edad de la gestante, sino también las características fenotípicas ecográficas del feto (marcadores ecográficos) y los marcadores bioquímicos de cromosomopatía en sangre materna, es decir, se trata del denominado: cribado combinado del primer trimestre. Estos programas de cribado permiten un cálculo del riesgo de síndrome de Down específico para cada gestante en función de los valores obtenidos para dichos marcadores. Con ello se establecen gestaciones de alto o de bajo riesgo de presentar trisomía 21. En los casos de alto riesgo, es potestad de la gestante decidir si desea o no realizarse una técnica invasiva para el diagnóstico.

Marcadores ecográficos

El mejor marcador ecográfico de las aneuploidías fetales más comunes, y en especial del síndrome de Down, es, sin duda, la translucencia nuchal (TN), o grosor de la zona econegativa de la nuca del feto. El incremento del grosor de la TN, medida entre las semanas 11 y 14, se correlaciona con la presencia de aneuploidías y fundamentalmente con la trisomía 21 (1).

Es el marcador ecográfico que presenta mayor efectividad para tal fin y, por tanto, la ecografía del primer trimestre desempeña un papel muy importante en el cribado prenatal de las aneuploidías.

La TN debe ser medida utilizando los criterios de la Fetal Medicine Foundation (www.fetalmedicine.com).

Los fetos afectados de trisomía 13 (síndrome de Patau) y trisomía 18 (síndrome de Edwards) también suelen presentar un incremento de la TN y, por lo tanto, esta también se utiliza como marcador para estas cromosomopatías.

La misma técnica debe ser utilizada para la valoración de la TN en gestaciones múltiples, aunque generalmente su realización es más compleja.

La ecografía morfológica de la semana 20 debe ser realizada siguiendo los criterios de la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO).

Es importante recordar que las gestaciones con una TN > al percentil 99 o superior a 3,5 mm que presenten un cariotipo normal son susceptibles de la realización de una ecografía morfológica precoz que incluya una valoración cardíaca (2).

Marcadores bioquímicos

Los marcadores bioquímicos son proteínas detectadas en la sangre materna y cuyo aumento o disminución, según el marcador, se correlaciona con la presencia de trisomía 21, motivo por el que son muy útiles en el establecimiento de un índice de riesgo de síndrome de Down.

Según la edad gestacional en la que presentan su mejor tasa de detección, se distinguen 2 tipos de marcadores bioquímicos: del primer y del segundo trimestre.

Son marcadores bioquímicos del primer trimestre:

- Fracción β libre de la gonadotropina coriónica ($\text{f}\beta\text{-HCG}$), que está elevada en la trisomía 21.
- Proteína plasmática asociada al embarazo (PAPP-A), que está disminuida en la trisomía 21.

Son marcadores bioquímicos del segundo trimestre:

- Alfafetoproteína (AFP), disminuida en la trisomía 21.
- $\text{f}\beta\text{-HCG}$, aumentada en la trisomía 21.
- Estriol no conjugado (uE3), disminuido en la trisomía 21.
- Inhibina A, aumentada en la trisomía 21.

La estimación del riesgo de que una gestante sea portadora de un feto con trisomía 21 se lleva a cabo una vez que se han determinado los marcadores bioquímicos mediante un programa (software) específico, al que se añaden los marcadores ecográficos cuando se realiza en el primer trimestre y datos antropométricos (edad materna, talla, peso materno, grupo racial o étnico, consumo de tabaco, diabetes dependiente de la insulina, gestación gemelar, etc.) de la gestante (3-4).

Técnicas invasivas

Las técnicas invasivas permiten completar el diagnóstico de numerosas afecciones fetales y, por ello, su implantación en los países desarrollados es muy amplia.

Por su carácter invasivo, no están exentas de complicaciones y conllevan cierto riesgo de interferir en la evolución de la gestación.

Por tanto, es esencial seleccionar las gestaciones que pueden beneficiarse de su realización. A pesar de esta selección, aproximadamente el 5% de las gestantes recibirán la recomendación de someterse a una técnica invasiva.

La indicación más común es el diagnóstico de las aneuploidías.

Las técnicas invasivas más empleadas son la biopsia corial y la amniocentesis (5-7).

Biopsia corial

Consiste en la extracción de una muestra de trofoblasto por vía transcervical o transabdominal. Permite estudios citogenéticos, moleculares y bioquímicos. Debido a que el cribado de aneuploidias ha evolucionado mucho en los últimos años, esto ha supuesto un aumento de las biopsias coriales. En la actualidad se considera que es la técnica de elección cuando es necesario estudiar el cariotipo fetal antes de la semana 15 de gestación y cuando se tienen que hacer estudios moleculares.

Las técnicas de laboratorio aplicadas rutinariamente pueden ser el método directo (procesamiento inmediato) o semidirecto (incubación entre 24 h y 3 días), que estudian células ya en división presentes en el trofoblasto, o el cultivo largo, que genera células procedentes del mesénquima vellositario y que puede prolongarse entre 2 y 3 semanas.

El estudio realizado a partir de las vellosidades coriales proporciona un resultado válido en el 99% de los casos y tiene un elevadísimo grado de precisión, especialmente para el diagnóstico de las aneuploidias más comunes. En estos casos, la contaminación materna es poco frecuente. Otra fuente de error son los mosaicos confinados a placenta, se observan en un 1-2% en cultivos cortos y 0.1% de los largos.

El mayor riesgo de la biopsia corial, es el riesgo de aborto.

Amniocentesis

Se distinguen 2 tipos: la precoz o del primer trimestre, que se realiza entre las semanas 11 y 14 + 6, y la clásica o del segundo trimestre, que se realiza de la semana 15 + 0 en adelante.

La eficacia de la amniocentesis (AC) ha sido demostrada en varios estudios multicéntricos en los que se ha comprobado que la precisión diagnóstica está por encima del 99%.

Son raros los fracasos de cultivo, complicación cuya frecuencia se sitúa en la mayoría de los laboratorios con experiencia por debajo del 1%.

La tasa de mosaicismos es menor que para la biopsia corial y se sitúa alrededor del 0,25%, pero la mayoría (70%) se confirma en el feto.

El mayor de los riesgos de la amniocentesis es el de la interrupción del embarazo.

Técnicas de diagnóstico citogenética y molecular

QF-PCR

La QF-PCR (Quantitative Fluorescence Polymerase Chain Reaction) combina la PCR, Reacción en Cadena de la Polimerasa que permite la amplificación del DNA que corresponde a cada uno de marcadores de los cromosomas donde se quiere estudiar las aneuploidias, con la técnica de fluorescencia cuantificable.

Las muestras de células se obtienen de modo similar a las descritas (amniocentesis, vellosidades corioideas, sangre fetal...), pero la QF-PCR muestra las siguientes ventajas (8, 9):

- No requiere cultivo de células por lo que es más rápida
- Permite realizar el diagnóstico de las aneuploidías y otras importantes anomalías cromosómicas en 24-48 horas
- Tiene una alta sensibilidad
- Muestra una alta especificidad

CARIOTIPO

En el diagnóstico citogenético se realiza un estudio cromosómico que analiza los posibles cambios en el número y estructura de los cromosomas, determinando su correlación con enfermedades, causadas por las anormalidades cromosómicas.

El estudio cromosómico también se le conoce con el nombre de cariotipo, y que permite el ordenamiento de los cromosomas de acuerdo con su tamaño y con la localización del centrómero.

Mediante ésta técnica junto a la tinción de bandas G (Giemsa) se pueden detectar anormalidades tanto numéricas como estructurales, en una población celular (o mosaicismos cromosómico), o incluso en una única célula.

La mayor desventaja del bandeo cromosómico es que está limitado a células en división (cromosomas en metafase), lo que requiere utilizar técnicas de cultivo celular retrasando

el diagnóstico. Asimismo, la resolución está limitada a reordenamientos cromosomales muy grandes de entre 5-8 Mb de tamaño.

A pesar de estas limitaciones, el bandeo cromosómico es la técnica citogenética más ampliamente usada en la práctica clínica de rutina para la identificación de anomalías cromosómicas en pacientes.

FISH EN INTERFASE

La técnica de FISH también se puede utilizar sobre células en interfase, para determinar el número de copias de uno o varios cromosomas. La ventaja principal de la FISH en interfase es que se puede realizar muy rápidamente, normalmente en 24 horas, porque no requiere crecimiento de las células en el laboratorio. Un buen ejemplo es el ensayo de aneuploidía, que se realiza sobre células del líquido amniótico cuando hay una alta indicación clínica de las trisomías más comunes. Se desnaturalizan los núcleos de la muestra, se hibridan con sondas específicas para los cromosomas 13, 18, 21, X e Y, y los resultados se obtienen en 24 horas. La prueba de aneuploidía debe de acompañarse también de un cariotipo para desechar cualquier anomalía no detectada mediante FISH.

Cálculo de riesgo

Mediante el software PRISCA V4.0. El punto de corte utilizado es 1/250 para trisomía 21 y 1/100 para la trisomía 18, estos puntos fueron los inicialmente recomendados por el proveedor del software. El programa de cálculo no está diseñado para estimar el riesgo de otras aneuploidías aunque como aumentan la concentración de hormonas en sangre también se puede utilizar.

Descripción de las variables

Disponemos de dos bases de datos recogidas en el mismo tiempo, desde enero de 2012 hasta el 30 de julio de 2013. Se disponen de 872 gestantes que se han sometido a una técnica invasiva y a las que se les ha hecho un diagnóstico prenatal por QF-PCR y 757 muestras de líquido amniótico a las que se les ha hecho un cariotipo

1. Datos de la paciente. Se recoge el nombre completo y los apellidos, el número de historia clínica.

2. Fecha de análisis. El día que se recibe la muestra en el laboratorio.
3. Año de Nacimiento de la gestante. Con esta variable podemos tener la edad de la gestante en años para poder relacionarla con otras variables y que puede aportar datos importantes al estudio.
.
4. Semanas de gestación.
5. Indicación diagnóstica. Nos indica el motivo por el que la gestante se somete a una técnica invasiva de diagnóstico prenatal. Las causas las agrupamos en cribado positivo, cuando se han sometido a una prueba de cribado en la semana 10-12. Antecedentes, si la paciente o su pareja tienen antecedentes de aneuploidía o patología cromosómica. Edad materna cuando el criterio para el diagnóstico es la edad avanzada de la madre (>35). Marcador ecográfico, en esta indicación diagnóstica incluimos la detección ecográfica de malformaciones o de marcadores, como la translucencia nuchal, que hagan preciso el diagnóstico prenatal. Ansiedad materna. Embarazos gemelares y otros para el resto de las indicaciones diagnósticas.
6. Doctor que envía la muestra.
7. Consulta desde la que se envía.
8. Centro desde el que se envía.
9. Sexo fetal.
10. Resultado del análisis. En esta epígrafe incluimos el resultado de las pruebas realizadas, tanto en cariotipo como QF-PCR

RESULTADOS

Se han estudiado 872 embarazadas por la técnica de QF-PCR y 757 por la técnica del cariotipo en la sección de Genética y Reproducción del HUMS durante el año 2012 y hasta julio del 2013. Las pacientes firman un consentimiento informado cuando se hacen la prueba. Los datos están tratados con la privacidad y confidencialidad que exige la ley.

Se someten a una amniocentesis y las muestras de líquido amniótico son estudiadas por cariotipo y QF-PCR

Las patologías halladas en el Hospital, durante los años 2012 hasta julio del 2013 son las que se resumen en la tabla 1.

Podemos observar que la más frecuente es el síndrome de Down, seguido de los Síndromes de Edwards, Patau y las patologías cromosómicas ligadas a los cromosomas sexuales, Klinefelter, Turner, Triplo X

Descripción de las patologías detectadas por QF-PCR y cariotipo		
	QF-PCR	CARIOTIPO
SINDROME DE DOWN	17	17
SINDROME DE EDWARDS	8	7
SINDROME DE PATAU	2	2
SINDROME DE KLINEFELTER	2	5
SINDROME DE TURNER	1	1
TRIPLO X	2	5
TRIPLOIDIA	1	2
TRISOMIA 22	0	2
45, XX t(13;14)(q10;q10)	0	3
46, XY inv(9)	1	0
46, XX del(18)(p11;p12;q18)	1	0
SINDROME DE DIGEORGE	1	0
NORMAL	836	713
PATOLOGICAS	36	44
TOTAL	872	757

Tabla 1. En esta tabla se describe la distribución de las patologías halladas en cada uno de los casos y el número de ellas y el porcentaje

Las muestras con resultados patológicos representan el 4% (36 casos) si se analizan por QF-PCR y suponen el 6% (44 casos) si la técnica utilizada es el cariotipo de bandas de alta resolución ($p>0.05$). El aumento del porcentaje observado con el cariotipo se debe a

que la técnica QF-PCR es una técnica para la detección de aneuploidias, mientras que con el cariotipo podemos detectar translocaciones, inversiones y delecciones.

Estadísticos de contraste

	QFPCR	CARIOTIPO
Chi-cuadrado	5,923 ^a	3,615 ^b
gl	5	7
Sig. asintót.	,314	,823

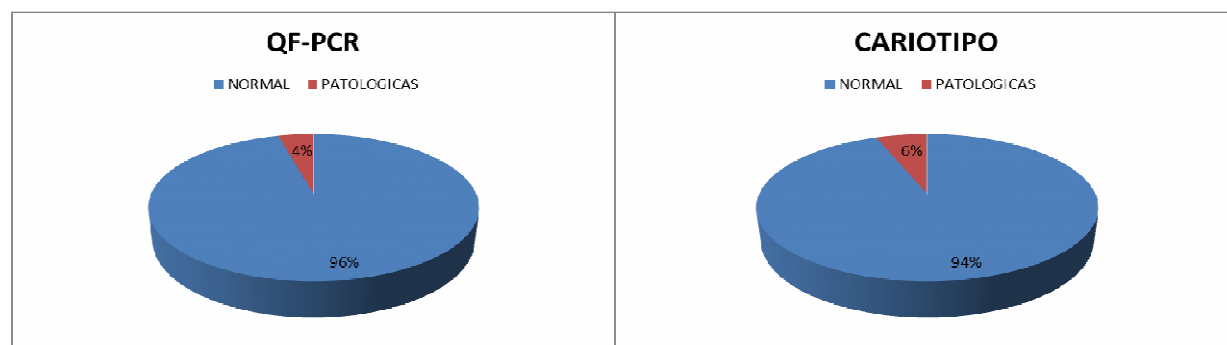


Fig 1. En esta figura se representa el porcentaje de detecciones normales y patológicas en las dos técnicas.

Cuando analizamos los resultados obtenidos por QF-PCR podemos observar que la patología mas detectada es el síndrome de Down con un 47%, después síndrome de Edwards (22%) y el resto de las aneuploidias y alteraciones cromosómicas detectadas en menos de un 6%, como se describe en la figura 2.

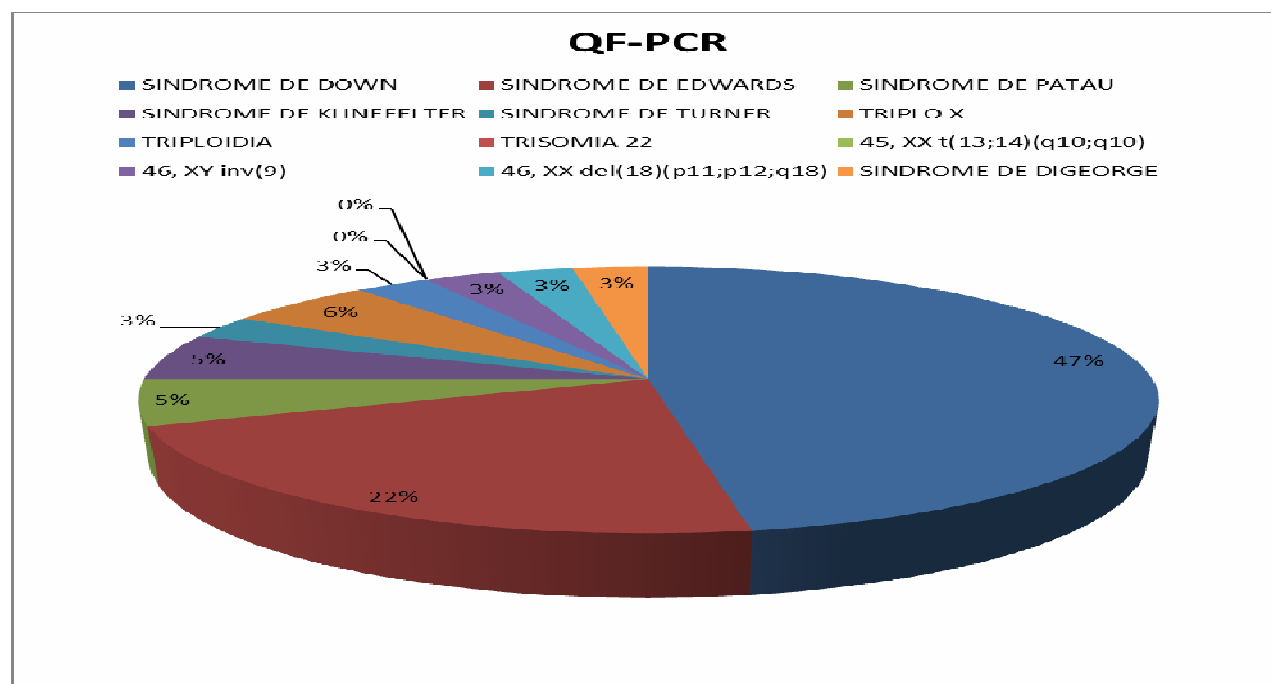


Fig 2. Distribución de las patologías detectadas con QF-PCR

El mismo análisis lo realizamos cuando trabajamos con cariotipo. Síndrome de Down (39%), Edwards (16%), como se puede observar en la figura 3.

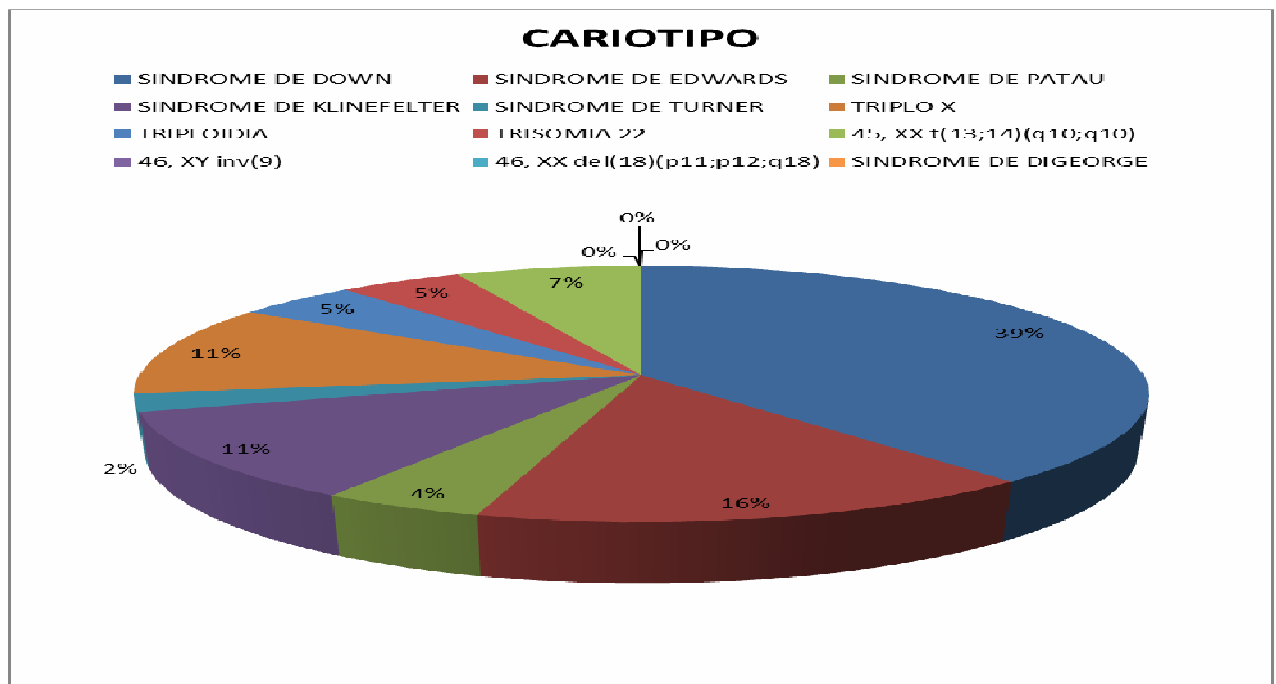


Fig 3. Distribución de las patologías detectadas con el cariotipo convencional.

Cuando se trata de cariotipo, podemos observar que se detectan una serie de anomalías cromosómicas, inversión, deleción y translocación que no están en el ámbito de detección de la QF-PCR, puesto que no constituyen alteraciones cromosómicas numéricas.

DISTRIBUCIÓN D E LAS PATOLOGÍAS POR SEXO.

Este apartado se describen las variables por sexo, observamos como se reparten las aneuploidias por sexo y vemos si estas diferencias son significativas

Sexo femenino

Tenemos un total de 407 mujeres que representan el 46.67% en el caso de muestras de líquido amniótico analizadas por QF-PCR y 350 mujeres en el caso de cariotipo (46,2%). La proporción de fetos de sexo femenino se reparte por igual en las muestras que se hacen por cada técnica.

	QF-PCR	CARIOTIPO
SINDROME DE DOWN	11	10
SINDROME DE EDWARDS	1	0
SINDROME DE PATAU	0	1
SINDROME DE KLINEFELTER	0	0
SINDROME DE TURNER	1	1
TRIPLO X	2	4
TRIPLOIDIA	2	2
TRISOMIA 22	0	0
45, XX t(13;14)(q10;q10)	0	3
46, XY inv(9)	0	0
46, XX del(18)(p11;p12;q18)	1	0
SINDROME DE DIGEORGE	1	0
NORMAL	388	329
PATOLOGICAS	19	21
TOTAL	407	350

Tabla 2. Distribución del número de casos de fetos de sexo femenino, por patología según la técnica empleada

De los 407 fetos con sexo femenino, 388 son normales y 19 patológicos, que representan el 95% y el 5%, respectivamente para los casos analizados con QF-PCR.

De los 350 fetos femeninos estudiados por cariotipo, 329 son normales y 21 casos presentan patología. El porcentaje que representan es el 94% y el 6% respectivamente.

Las diferencias no son significativas, $p > 0.05$

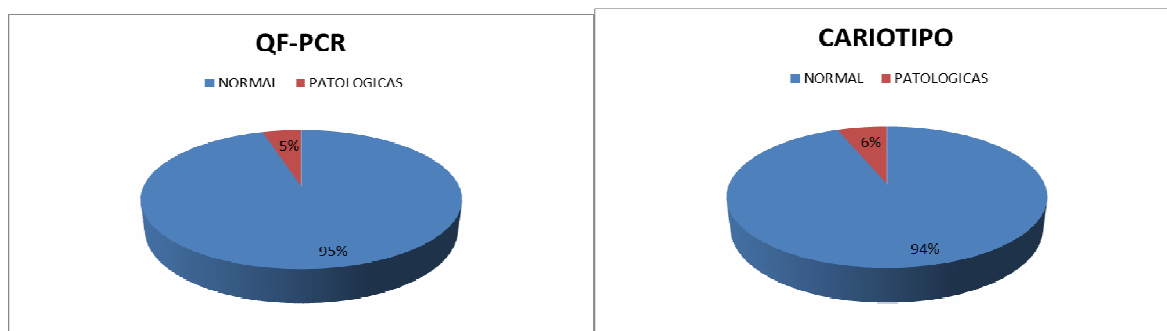


Fig4. En esta figura se representa el porcentaje de detecciones normales y patológicas en las dos técnicas en mujeres.

Distribución de las aneuploidias detectadas por ambas técnicas. Como se muestra en la figura 5, el 58% de las afectas de una aneuploidía son por Síndrome de Down. Se diagnostican en un porcentaje de un 11% casos de Triplo X y Triploidía

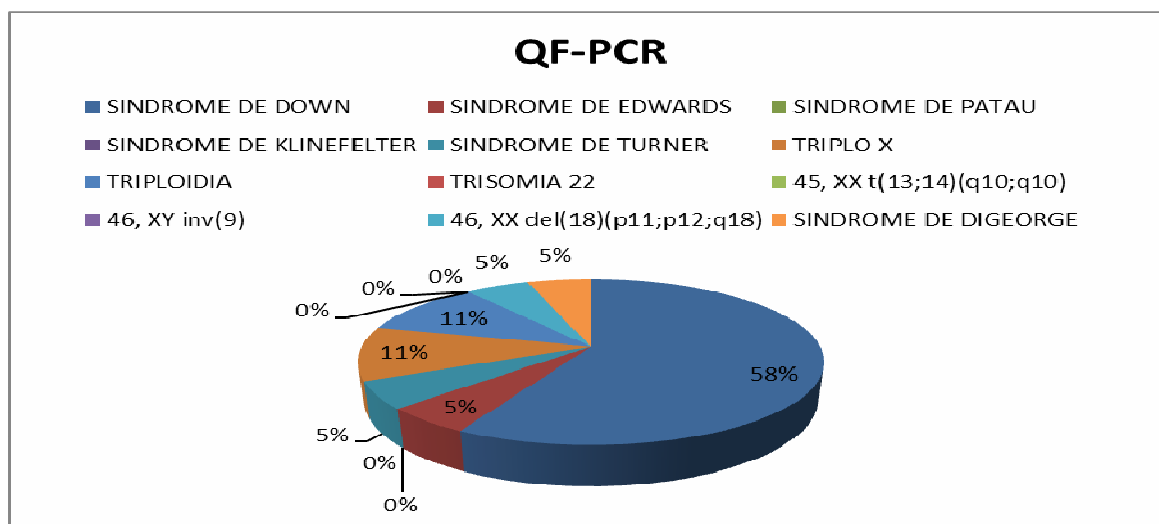


Fig 5. Distribución de las patologías detectadas con QF-PCR

En el caso de las muestras de líquido amniótico (LA) que se estudian por cariotipo, el 48% pertenece a casos de síndrome de Down y el resto se reparte de forma más uniforme, como se muestra en la figura 6.

Las diferencias no son estadísticamente significativas,

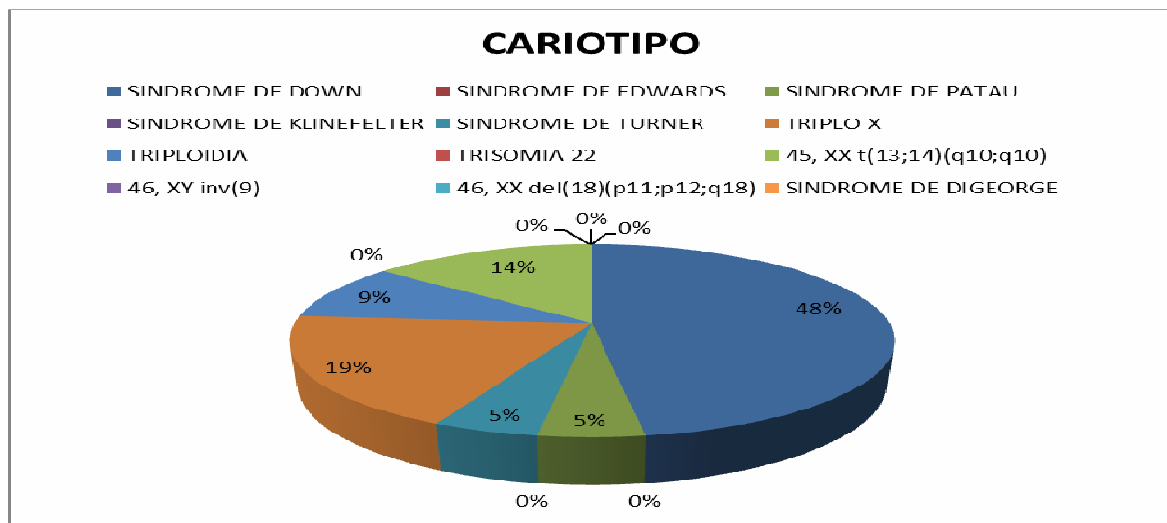


Fig 6. Distribución de las patologías detectadas con el cariotipo convencional.

Sexo masculino

Tenemos un total de 419 varones que representan el 50.12% en el caso de muestras de líquido amniótico analizadas por QF-PCR y 363 varones en el caso de cariotipo (47.95%). La proporción de fetos de sexo masculino se reparte por igual en las muestras que se hacen por cada técnica.

	QF-PCR	CARIOTIPO
SINDROME DE DOWN	6	7
SINDROME DE EDWARDS	7	7
SINDROME DE PATAU	2	1
SINDROME DE KLINEFELTER	2	5
SINDROME DE TURNER	0	0
TRIPLO X	0	0
TRIPLOIDIA	2	2
TRISOMIA 22	0	2
45, XX t(13;14)(q10;q10)	0	0
46, XY inv(9)	1	0
46, XX del(18)(p11;p12;q18)	0	0
SINDROME DE DIGEORGE	0	0
NORMAL	399	339
PATOLOGICAS	20	24
TOTAL	419	363

Tabla 3. Distribución del número de casos de fetos de sexo masculino, por patología según la técnica empleada

De los 419 fetos con sexo masculino, 399 son normales (95%) y 19 (5%) patológicos, para los casos analizados con QF-PCR.

De los 363 fetos masculinos estudiados por cariotipo, el 94% son normales y el 6% patológicos. Las diferencias no son significativas, $p>0.05$.

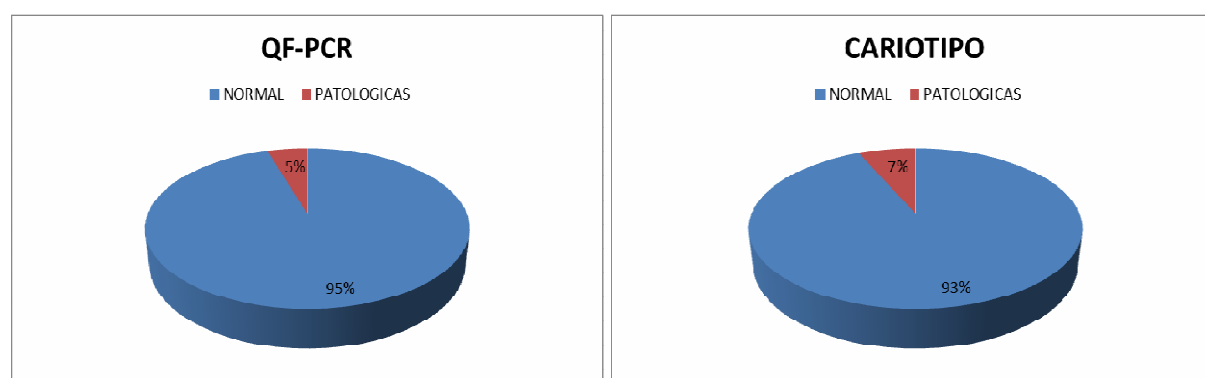


Fig 7. En esta figura se representa el porcentaje de detecciones normales y patológicas en las dos técnicas en varones

Si analizamos la distribución de las patologías que se obtienen con las distintas técnicas de laboratorio, observamos que para la QF-PCR, el 30% son síndrome de Down, el 35% son Síndrome de Edwards y el resto se distribuyen de forma homogénea, representando un 10% (fig7)

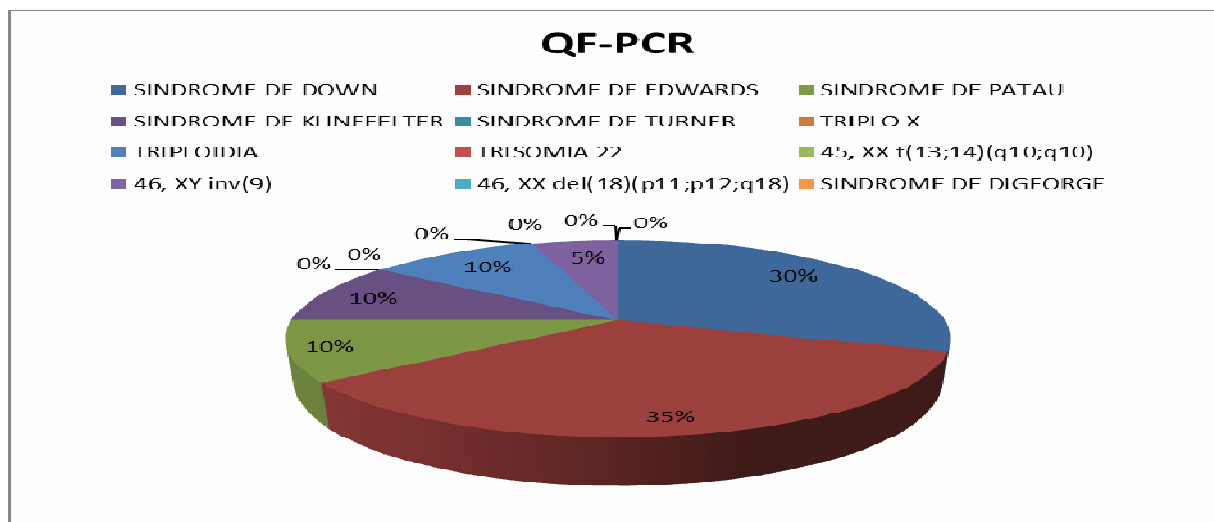


Fig 7. Distribución de las patologías detectadas con QF-PCR

Edwards y Down suponen un 29% para los casos de cariotipos, el 21% de las patologías detectadas son síndrome de Klinefelter. En el caso de las muestras de LA que llegan al laboratorio y se analizan con un cariotipo, se observa que el porcentaje de las patologías halladas es bastante homogéneo según la frecuencia y la prevalencia.

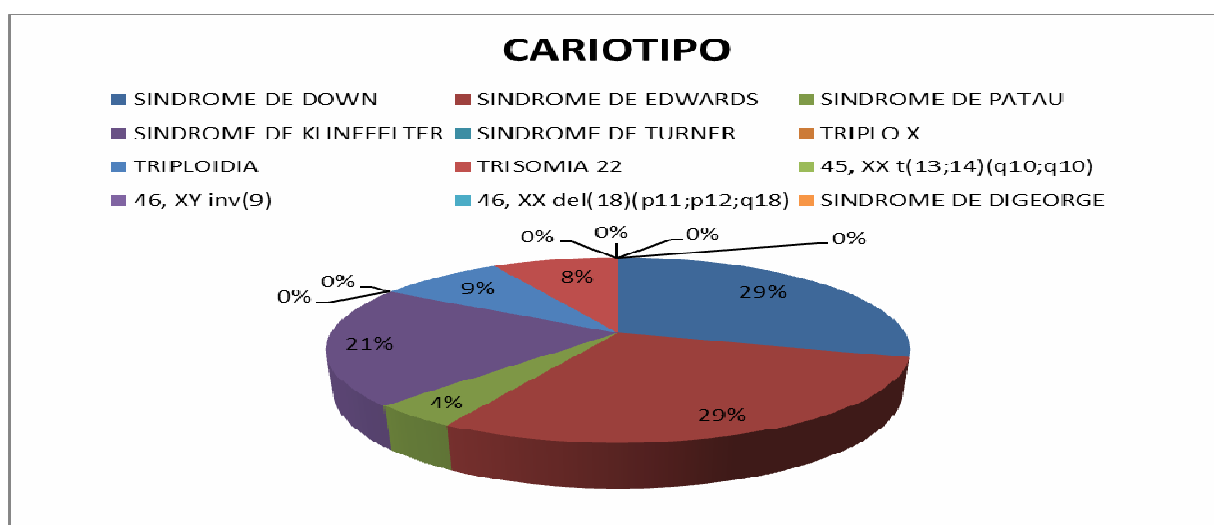


Fig 8. Distribución de las patologías detectadas con el cariotipo convencional

DISTRIBUCION DE LAS PATOLOGIAS POR INDICACION DIAGNOSTICA

QF-PCR

En este capítulo se va a describir como relacionamos el hallazgo de patología según la indicación diagnóstica.

De los 413 casos que se enviaron por tener cribado positivo (45.5%), 393 son normales (95.1%) y 20 (4.9%) patológicos. Se mantiene la proporción como en los casos totales, sin tener en cuenta el diagnóstico.

Se reciben 174 muestras por marcador ecográfico positivo (19,95%) del total y se hallan 167 normales (96%) y 7 patológicos (4%).

Cuando son los antecedentes de patología cromosómica la indicación diagnóstica, se recogen 38 muestras (4,4%) y solo se obtiene un resultado patológico (2.63%).

Motivo de prueba invasiva: edad materna. 150 casos (17,2%), 7 casos patológicos que suponen un 4,7%.

Para las muestras recibidas por ansiedad, embarazos gemelares y otros motivos, no se hallan casos patológicos.

Podemos decir que el cribado del primer trimestre es una buena prueba diagnóstica puesto que la mayoría de los casos que encontramos con patologías viene por haber tenido un cribado combinado positivo.

DIAGNOSTICO	DOWN	EDWARDS	KLINEFELTER	PATAU	TURNER	TRIPLOX	TRIPLOIDIA	46, XX del(18) (p11;p12;q18)	46, XY inv(9)	DIGEORGE
CRIBADO POSITIVO	12	4	0	1	1	1	1	1	0	0
MARCADOR ECOGRAFICO	2	3	1	0	0	0	0	0	0	1
ANTECEDENTES	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EDAD MATERNA	2	1	1	1	0	1	0	0	1	0
ANSIEDAD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GEMELAR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OTROS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	17	8	2	2	1	2	1	1	1	1

Tabla 4. Distribución de patologías por indicación diagnóstica para técnica de QF-PCR

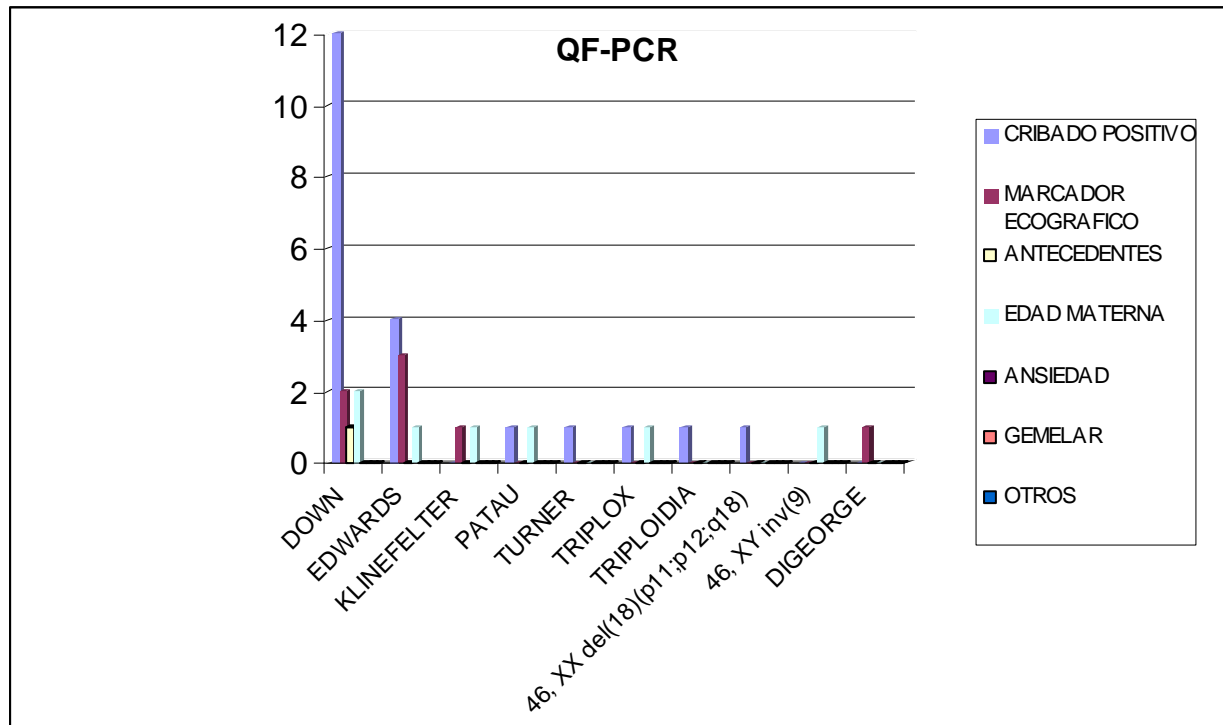


Fig. 9. En esta figura se muestra como se distribuyen las patologías según la indicación diagnóstica

Se puede observar que la patología mas frecuente es el síndrome de Down y se detecta en un mayor porcentaje en aquellas gestantes que tienen un cribado combinado del primer trimestre positivo. La siguiente patología mas frecuente es el síndrome de Edwards. En este caso, el cribado positivo es un buen método de diagnostico, pero también los marcadores ecográficos. En el resto de anomalías no hay diferencias tan grandes como para poder afirmar que se diagnostica mejor por un método que por otro

CARIOTIPO

Hacemos el mismo análisis para las muestras a las que se les hizo un cariotipo.

Cribado positivo. Supone un 48% del total de las muestras. De las muestras enviadas por cribado positivo se encontraron 316 (92.4%) normales y 26 (7,6%) con patología.

Marcador ecográfico. Supone un 19.3% del total de las muestras. De las enviadas por marcador ecográfico se encontraron 131 (95%) normales y 7 (5%) con patología

Antecedentes. 35 muestras en total que suponen un 4,9%. Se obtuvieron 31 (88.6%) resultados normales y 4 (11,4%) con patología.

Edad materna. De las 147 (20.6%) muestras, 140 (95.2%) fueron normales y 7(4.8%) patológicos

El resto de los motivos de cariotipo dieron resultados normales, igual que cuando se hace QF-PCR

DIAGNOSTICO	DOWN	EDWARDS	KLINEFELTER	PATAU	TURNER	TRIPLOX	TRIPLOIDIA	TRISOMIA22	45, t(13;14) (q10;q10)	XX
CRIBADO POSITIVO	11	4	3	1	1	2	2	1	1	
MARCADOR ECOGRAFICO	3	1	1	0	0	0	0	2	0	
ANTECEDENTES	1	0	1	0	0	0	0	0	2	
EDAD MATERNA	2	2	0	1	0	2	0	0	0	
ANSIEDAD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
GEMELAR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
OTROS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
TOTAL	17	7	5	2	1	4	2	3	3	

Tabla 5. Distribución de patologías por indicación diagnóstica para técnica de cariotipo.

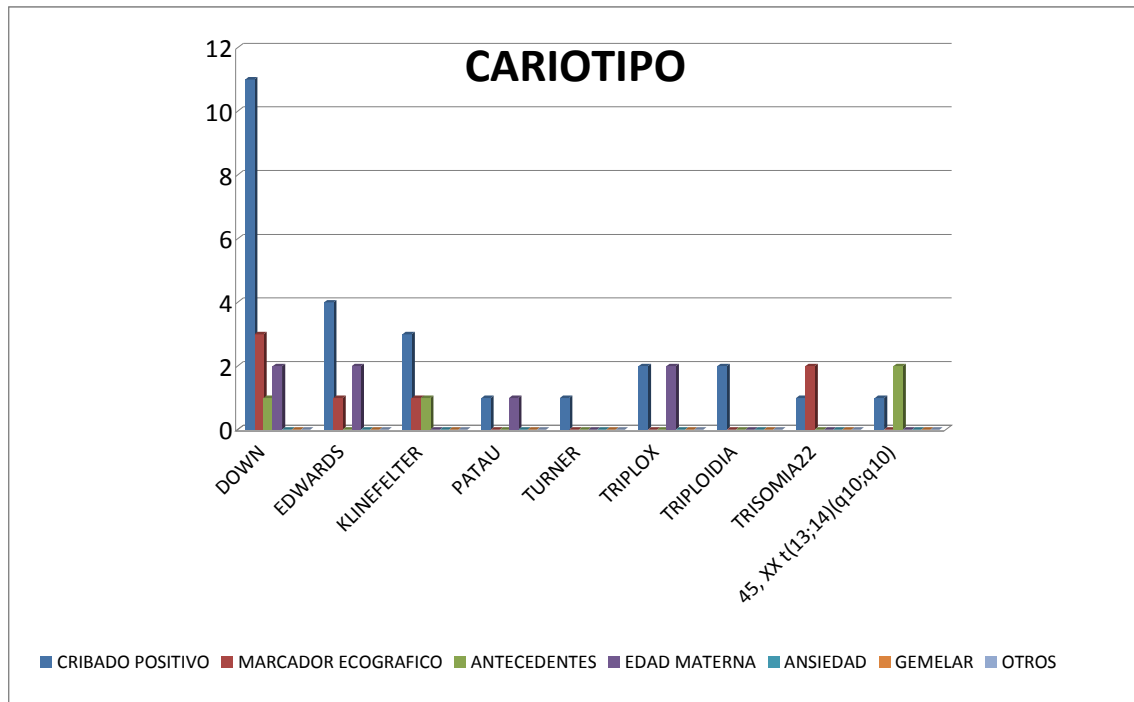


Fig. 10. se representa en la siguiente gráfica como se reparte las muestras según la indicación diagnóstica y el resultado patológico

Se continua observando, como en el caso de QF-PCR que se distribuyen de la misma manera. La mayor parte de los casos patológicos vienen porque han tenido un resultado del cribado combinado del primer trimestre positivo. El Síndrome de Down es el más frecuente de todas las anomalías cromosómicas.

Haciendo un test Chi-cuadrado, los resultados obtenidos por QF-PCR y Cariotipo no presentan diferencias estadísticamente significativas.

EDAD MATERNA

Al analizar como influye la edad materna en el diagnóstico de aneuploidías.

Se calculan las medias de edad de cada uno de los distintos grupos de patologías. Se comparan con la media y destaca que las diferencias no son estadísticamente significativas. Aun así hay diferencias que son para mencionar.

Informe			
AÑOS			
RESULTADOS	Media	N	Desv. típ.
NORMAL	36,04	798	5,155
DOWN	38,29	17	4,845
EDWARDS	39,25	8	3,536
PATAU	41,50	2	3,536
KLINEFELTER	34,00	2	8,485
TURNER	34,00	1	.
TRIPLO X	42,50	2	3,536
TRIPLOIDIA	36,00	1	.
Total	36,14	831	5,155

Tabla 6. tabla de medias de edades por grupos de patología

Tabla de ANOVA								
			Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	
AÑOS RESULTADOS	*	Inter- grupos		315,946	7	45,135	1,709	,103
		Intra-grupos		21736,581	823	26,411		
		Total		22052,527	830			

Tabla 7. Vemos que no hay diferencias estadísticamente significativas

Para todas las aneuploidías, la edad materna es un factor importante a excepción del Síndrome de Klinefelter y del Síndrome de Turner que están por debajo de la media, Triploidia que está en la media, el resto de las patologías están asociadas a la edad materna de una forma proporcional.

DISCUSIÓN

Se han estudiado 872 embarazadas por la técnica de QF-PCR y 757 por la técnica del cariotipo en la sección de Genética y Reproducción del HUMS durante el año 2012 y hasta julio del 2013.

Se someten a una amniocentesis y las muestras de líquido amniótico son estudiadas por cariotipo y QF-PCR.

De las patologías halladas en el Hospital, durante los años 2012 hasta julio del 2013 (tabla I), podemos observar que la más frecuente es el síndrome de Down, seguido de los Síndromes de Edwards, Patau y las patologías cromosómicas ligadas a los cromosomas sexuales, Klinefelter, Turner, Triplo X.

Las muestras con resultados patológicos representan el 4% (36 casos) si se analizan por QF-PCR y suponen el 6% (44 casos) si la técnica utilizada es el cariotipo de bandas de alta resolución ($p > 0.05$). El aumento del porcentaje observado con el cariotipo se debe a que la técnica QF-PCR es una técnica para la detección de aneuploidias, mientras que con el cariotipo podemos detectar translocaciones, inversiones y deleciones.

Por las dos técnicas evaluadas, el resultado más frecuente es el síndrome de Down (Figuras 2 y 3), para el que existen los mejores marcadores. Este resultado está de acuerdo con los datos de la literatura.

DISTRIBUCIÓN D E LAS PATOLOGÍAS POR SEXO.

En la distribución por sexo, los fetos femeninos suponen un 46% en ambas técnicas. Se detectan un porcentaje de patológicos muy similar y el síndrome más frecuente es el Síndrome de Down, 58% y 48% para QF-PCR respectivamente. El resto de las aneuploidias se reparten uniformemente (figuras 4, 5 y 6).

En el caso de los fetos de sexo masculino, los porcentajes de detección de patología son similares a las mujeres (Figura 7), pero existe una clara diferencia en cuanto a distribución (Figura 8). El síndrome de Down y de Edwards tienen casi el mismo porcentaje, 30%. No hay en datos en la literatura que indique que la incidencia del Síndrome de Edwards sea mayor en varones, lo cual puede significar que hay poca cantidad de muestra como para que se puedan hacer (11).

DISTRIBUCION DE LAS PATOLOGIAS POR INDICACION DIAGNOSTICA

En cuanto a cómo relacionamos el hallazgo de patología según la indicación diagnóstica, podemos decir que se mantienen las proporciones como en los casos totales, sin tener en cuenta el diagnóstico (Tabla 4).

En las muestras de pacientes que han tenido un cribado positivo es donde se detecta un mayor número de resultados patológicos con lo cual podemos decir que el cribado del primer trimestre es una buena prueba diagnóstica puesto que la mayoría de los casos que encontramos con patologías viene por haber tenido un cribado combinado positivo.

Con ninguna de las dos técnicas se hallan anomalías si vienen al laboratorio por ansiedad materna, embarazos gemelares y el grupo heterogéneo otros.

EDAD MATERNA

La edad materna es un factor importante a excepción del Síndrome de Klinefelter y del Síndrome de Turner que están por debajo de la media, Triploidía que está en la media, el resto de las patologías están asociadas a la edad materna. Está descrito en la literatura (2) que la edad materna afecta, pero que no es conveniente utilizarlo como criterio exclusivo.

Las limitaciones de este estudio son que está realizado en un espacio de tiempo corto con lo cual el número de muestras puede resultar escaso para estudiar la incidencia de las distintas patologías y como se distribuyen.

La recogida de datos es complicada y el análisis al ser variables cualitativas es complicado, sin embargo el hecho de que no haya diferencias significativas, hace que los resultados permitan generalizar los resultados.

El objetivo inicial del estudio consistía en realizar un estudio sobre los límites de detección de las dos técnicas aquí expuestas, QF-PCR y cariotipo y hemos podido comprobar que ambas técnicas se comportan de la misma manera, lo cual no hace que una sea mejor que la otra.

Hemos observado que con el cariotipo podemos diagnosticar alguna patología tipo translocación, deleción o inversión, pero en el ámbito que se utiliza el diagnóstico prenatal, para la detección de las aneuploidias más frecuentes, el cariotipo, no aporta nada nuevo. La QF-PCR es una técnica mucho más rápida, lo que le da un valor añadido, aunque también tiene un coste más elevado.

Con ambas técnicas es necesario, en caso de patología, comprobar por FISH.

Estos resultados permiten elegir cualquiera de las dos técnicas, según la disponibilidad de cada una de ellas, facilitando el trabajo en el laboratorio.

CONCLUSIONES

Tanto la técnica de cariotipo como la QF-PCR, permite detectar las aneuploidias mas frecuentes con la misma sensibilidad. El cariotipo es una técnica más lenta y laboriosa, pero más económica. En los casos de diagnóstico prenatal, dado la ansiedad que lleva para la gestante, la rapidez en el diagnóstico le da un valor añadido. Se pueden usar las dos técnicas según la elección del momento. En todos los casos, habría que confirmar por FISH.

En cuanto a las indicaciones diagnósticas por las que se hacen estas pruebas, el cribado positivo es un buen indicador de anomalía cromosómica, la edad materna está muy relacionada, pero por si sola no sería un buen indicador. Y ansiedad materna, embarazos gemelares y las causas esporádicas no serían indicadores de patología cromosómica.

Constituye un tema relevante dentro de la Salud Pública el cribado y detección de anomalías cromosómicas. Una buena indicación diagnóstica y una elección adecuada de la técnica podrían ser económicamente más rentable lo cual permitiría un uso prolongado.

BIBLIOGRAFIA

1. Snijders RJ, Thom EA, Zachary JM, Platt LD, Greene N, Jackson LG, et al. First-trimester trisomy screening: nuchal translucency measurement training and quality assurance to correct and unify technique. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2002;19:353–9.
2. Van den Hof MC, Wilson RD, Diagnostic Imaging Committee, Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada; Genetics Committee, Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada. Fetal soft markers in obstetric ultrasound. *J Obstet Gynaecol Can.* 2005;27:592–636.
3. Spencer K. Screening for trisomy 21 in twin pregnancies in the first trimester using free beta-hCG and PAPP-A, combined with fetal nuchal translucency thickness. *Prenat Diagn.* 2000;20: 91–5.
4. Spencer K, Nicolaides KH. A first trimester trisomy 13/trisomy 18 risk algorithm combining fetal nuchal translucency thickness, maternal serum free beta-Hcg and PAPP-A. *Prenat Diagn.* 2002;22: 877–9.
5. Nicolaides K, Brizot M de L, Patel F, Snijders R. Comparison of chorionic villus sampling and amniocentesis for fetal karyotyping at 10-13 weeks' gestation. *Lancet.* 1994;344:435–9.
6. Kong CW, Leung TN, Leung TY, Chan LW, Sahota DS, Fung TY, et al. Risk factors for procedure-related fetal losses after mid-trimester genetic amniocentesis. *Prenat Diagn.* 2006;26:925–30.
7. Mazza V, Pati M, Bertucci E, Re C, Ranzi A, Percesepe A, et al. Age-specific risk of fetal loss post second trimester amniocentesis: analysis of 5.043 cases. *Prenat Diagn.* 2007;27:180–3.

8. Mann K, Donaghue C, Fox SP, Docherty Z, Ogilvie CM. Strategies for the rapid prenatal diagnosis of chromosome aneuploidy. *Eur J Human Genet* 2004 (Nov); 12(11): 907-15.
9. Cirigliano V, Voglino G, Canadas MP, Marongiu A, Ejarque M, Ordonez E, Plaja A, Massobrio M, Todros T, Fuster C, Campogrande M, Egozcue J, Adinolfi M. Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR. Assessment on 18,000 consecutive clinical samples. *Molec Human Reproduct* 2004 (Nov); 10(11): 839- 46.
10. Ramírez Garrido FA, Ulibarrena Estevez J, Valverde Cuesta S, Ramayo Barrrio E, Camacho Carretero A. Modelo de control de calidad para marcadores bioquímicos y ecográficos del cribado prenatal de aneuploidías fetales. *Rev Lab Clin.* 2012;5:182-7
11. Zhou Yi, Xie Yingjuna, Chen Yongzhena, Zhong Liangying b, Shang Meijiao, Chen Baojianga. Prenatal diagnosis of pure partial monosomy 18p associated with holoprosencephaly and congenital heart defects. *Gene* 533 (2014) 565–9